

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARLOS VINÍCIUS JACKES DE OLIVEIRA

ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE *Ziziphus joazeiro*
(JUAZEIRO) DO BIOMA CAATINGA FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE
Staphylococcus aureus

Recife
2018

CARLOS VINÍCIUS JACKES DE OLIVEIRA

**ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE *Ziziphus joazeiro*
(JUAZEIRO) DO BIOMA CAATINGA FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE
*Staphylococcus aureus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências biológicas.

Orientadora: Prof.a Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Coorientadora: Prof.a Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Oliveira, Carlos Vinícius Jackes de

Actinobactérias isoladas da rizosfera de *Ziziphus joazeiro* (Juazeiro) do bioma da caatinga frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* / Carlos Vinícius Jackes de Oliveira. – 2018.

35 f. : il.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho.

Coorientadora: Gláucia Manoella de Souza Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Bactérias 2. Agentes anti-infecciosos 3. *Staphylococcus aureus* I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orientadora). (orientadora). II. Lima, Gláucia Manoela de Souza (coorientadora). III. Título.

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 146

Carlos Vinícius Jackes de Oliveira

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE
Ziziphus joazeiro (JUAZEIRO) DO BIOMA CAATINGA FRENTE A ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, como critério parcial para obtenção do título de mestre em Ciências biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia

Aprovado em: 19/02/2018

Prof.a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco
Orientadora

Prof.a Dr.a Patrícia Maria Guedes Paiva
Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco
Banca examinadora – Membro interno titular

Prof.a Dr.a Norma Buarque de Gusmão
Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco
Banca examinadora – Membro externo titular

Recife, 19 de fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde e por aturar as minhas eternas reclamações.

Aos meus pais, pelo incansável incentivo a minha formação acadêmica e pelo suporte emocional e financeiro prestado.

A prof.a Luana Cassandra, por toda atenção e orientação nesses anos de formação científica.

A prof.a Gláucia, pela orientação e por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa. Mais do que a chefe, a sra. é uma amiga.

A prof.a Kêsia, por todas as orientações para a minha formação pessoal e profissional, toda atenção e simpatia. Não tenho palavras para descrever o carinho que tenho por sua pessoa.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética de Micro-organismos e do Laboratório de Processos Biotecnológicos, pela ajuda nos experimentos, as pausas para o café e todos os outros bons momentos compartilhados. Não teriam sido anos tão bons se não fosse por vossa companhia.

A Maria Cláudia, Rosilma, Igor, Rayssa e João, por todo carinho de vocês para comigo. Os laços de amizade feitos, ainda que não sejam duradouros, são a minha maior herança.

Aos meus amigos de longa data, o que seria de minha pessoa se não pudesse contar com vocês? Agradeço especialmente a Jéssica, Wadja e Arley por amenizar as minhas sessões de drama de novela mexicana.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), pelo suporte técnico-científico; especialmente a Adenilda, por toda atenção, paciência e simpatia.

A Capes, pelo suporte financeiro por que é preciso mais do que esforço e dedicação para fazer pesquisa científica.

A todos os citados e a muitas outras pessoas, meus sinceros agradecimentos.

“Existem horas normais e horas inúteis, nas quais o tempo para e escorre e a vida - a vida real - parece distante.”

Jojo Moyes

RESUMO

O aumento dos registros de infecções hospitalares causadas por bactérias multidroga resistentes mantém a busca por novos antibióticos como sendo um importante objeto de estudo. Nesta perspectiva as actinobactérias, entre os micro-organismos isolados do ambiente, destacam-se por apresentar grande potencial para produção de substâncias bioativas, especialmente antibióticos. O objetivo deste trabalho foi identificar linhagens de actinobactérias isoladas de solo da Caatinga e avaliar a produção de substâncias com atividade anti-estafilocócica. Foram utilizadas 04 linhagens de actinobactérias registradas como J168, J181, J835 e J867. A caracterização morfofisiológica foi realizada com base no *International Streptomyces Project*, a análise molecular foi realizada a partir do gene 16 S rRNA, foi avaliada a produção de esterase, pectinase, celulase, amilase e protease a partir do teste de degradação do substrato em placa e testes de atividade antimicrobiana frente a 05 cepas de *Staphylococcus aureus*, 04 delas multidroga resistentes (eritromicina, clindamicina e oxacilina). Seis meios de fermentação foram utilizados para o cultivo submerso e, a partir do mosto fermentado, foi realizado o teste, através da metodologia de disco-difusão. Após centrifugação, a biomassa e o líquido metabólico obtidos foram tratados com diferentes solventes. Os extratos brutos obtidos foram avaliados quanto atividade antimicrobiana e aquele que apresentou o melhor resultado, foi concentrado e utilizado no teste de microdiluição em placa. A abordagem de identificação polifásica permitiu a identificação de 01 entre as 04 linhagens de actinobactérias estudadas, sendo a linhagem J181 identificada com *Streptomyces diastatochromogenes*. Foi observada a produção de enzimas extracelulares por todas as linhagens testadas. A prospecção de metabólitos com atividade anti-estafilocócica apresentou resultados positivos para as linhagens J181 e J867, mas apenas a linhagem J181 mostrou atividade frente todas as cepas de *S. aureus*, com halos de inibição entre 14 – 16 mm no teste de disco difusão. Os melhores resultados foram para o extrato bruto da biomassa tratado com etanol. A concentração mínima inibitória para o extrato bruto da biomassa foi >1000 µg/ml frente as cepas de *S. aureus*, demonstrando a baixa atividade antimicrobiana de *S. diastatochromogenes* J181. Actinobactérias são micro-organismos muito versáteis metabolicamente, desta forma o uso de uma abordagem polifásica foi imprescindível para caracterização das linhagens estudadas. O ensaio realizado indicou potencial para produção de esterases e pectinases por J867 e celulases por J835. *S. diastatochromogenes* é relatado como produtor de metabólitos com atividade frente a células eucariontes e com atividade antibacteriana baixa ou ausente, conforme observado neste estudo.

Palavras – chave: Actinobactéria. *Staphylococcus aureus*. *Streptomyces diastatochromogenes*.

ABSTRACT

Increased regimens of hospital-acquired infections caused by multidrug-resistant bacteria maintain the search for new antibiotics as an important object of study. In this perspective, actinobacteria, among microorganisms isolated from the environment, stand out because they present great potential for the production of bioactive substances, especially antibiotics. The objective of this work was to identify strains of actinobacteria isolated from Caatinga soil and to evaluate the production of substances with anti-staphylococcal activity. Four lines of actinobacteria registered as J168, J181, J835 and J867 were used. The morphophysiological characterization was carried out based on the *International Streptomyces Project*, molecular analysis was performed from the 16 S rRNA gene, the production of esterase, pectinase, cellulase, amylase and protease from the plate substrate degradation test and antimicrobial activity tests against 05 strains of *Staphylococcus aureus*, 04 of them multidrug resistant (erythromycin, clindamycin and oxacillin). Six fermentation media were used for the submerged culture and, from the fermented must, the test was performed, using the disc-diffusion methodology. After centrifugation, the biomass and the metabolic liquid contained were treated with different solvents. The obtained crude extracts were evaluated as antimicrobial activity and the one that presented the best result, was concentrated and used in the plate microdilution test. The polyphase identification approach allowed the identification of 01 among the 04 strains of actinobacteria studied, the lineage J181 being identified with *Streptomyces diastatochromogenes*. The production of extracellular enzymes was observed for all tested lineages. The prospection of metabolites with anti-staphylococcal activity showed positive results for the J181 and J867 strains, but only the J181 strain showed activity against all strains of *S. aureus*, with inhibition halos between 14-16 mm in the diffusion disc test. The best results were for the crude extract of the biomass treated with ethanol. The minimum inhibitory concentration for the crude biomass extract was $> 1.000 \mu\text{g/ml}$ against *S. aureus* strains, demonstrating the low antimicrobial activity of *S. diastatochromogenes* J181. Actinobacteria are very versatile metabolic microorganisms, so the use of a polyphase approach was essential for the characterization of the studied strains. The assay performed indicated potential for J867 esterases and pectinases and J835 cellulases. *S. diastachromogenes* is reported to be a producer of metabolites with activity against eukaryotic cells and with low or absent antibacterial activity, as observed in this study.

Key words: Actinobactéria. *Staphylococcus aureus*. *Streptomyces diastatochromogenes*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Aspecto micromorfológico das cadeias de esporos de alguns gêneros de actinobactérias.	17
Figura 2: Identificação dos fenótipos de resistência aos antibióticos expressos por <i>S. aureus</i> ao longo dos anos. Fonte: o autor.....	25
Quadro 1: Fatores de virulência expressos por <i>Staphylococcus aureus</i>	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O SEMIÁRIDO BRASILEIRO: O BIOMA CAATINGA	13
3.1.1 <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	14
3.2 ACTINOBACTÉRIAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS	16
3.2.1 Potencial biotecnológico de actinobactérias	17
3.3 COCOS GRAM-POSITIVOS DE INTERESSE CLÍNICO	20
3.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> : características gerais	20
3.3.2 Fenótipos de resistência aos antimicrobianos em <i>Staphylococcus aureus</i>	23
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
REFERENCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

A infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) por bactérias multidroga resistentes são reconhecidamente um grave problema da saúde pública em nível mundial, pois estão relacionados ao aumento dos casos morbidade e mortalidade, de maior custo financeiro necessário ao longo período de internação do paciente, além da utilização de antibióticos mais potentes para o tratamento destes quadros infecciosos (CHUSRI *et al.*, 2014). A utilização dessas drogas, consideradas de “última escolha”, exerce uma pressão seletiva sobre as bactérias presentes no ambiente hospitalar e favorece o aparecimento de cepas ainda mais resistentes (SOUSA *et al.*, 2016).

Entre os cocos gram-positivos, o *Staphylococcus aureus* destaca-se como principal agente causador de quadros de infecções nosocomiais (SOUZA *et al.*, 2013), especialmente as cepas que expressam resistência aos β -lactâmicos, denominadas genericamente de MRSA (*Staphylococcus aureus* Meticilin Resistent) (WEI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017;).

Devido a este quadro preocupante, a busca por estratégias para uso consciente dos antibióticos (GARAU *et al.*, 2014), a minimização dos fatores de risco predisponentes as infecções nosocomiais (SAINT, 2017; BOEV e KISS, 2017) e busca por novos antibióticos oriundos de fontes naturais ou sintéticas são ações tidas como prioritárias por governos e comunidades científica (LING *et al.*, 2015).

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, deu início a era de ouro dos antibióticos (ROLAIN *et al.*, 2016) que apresentou grande expansão nas décadas seguintes, até meados de 1970, quando foram descobertos grande parte dos antibióticos que são utilizados atualmente na prática médica (KAMALA e SILVAPEMURAL, 2017). Neste período destacam-se os trabalhos da equipe do pesquisador Selman Waksman, que explorou extensivamente o cultivo em laboratório de micro-organismos oriundos do ambiente, especialmente do solo, para prospecção de metabólitos bioativos, especialmente aqueles com atividade antibacteriana (WENCEWICZ, 2016). Entre os micro-organismos isolados por Waksman, as actinobactérias foram e são, reconhecidamente, a mais importante fonte de metabólitos bioativos de origem microbiana, principalmente aqueles com atividade antibiótica (ELBENDARY *et al.*, 2018) tendo o gênero *Streptomyces* como o mais relevante biotecnologicamente, uma vez que cerca de 500 espécies de *Streptomyces* são responsáveis por produzir entre 70 a 80% dos metabólitos bioativos relacionados com várias atividades biológicas em uso no mercado (HASSAN *et al.*, 2017).

O solo é o habitat mais explorado quanto ao isolamento e prospecção de actinobactérias, desta forma, as características do ambiente influenciam diretamente a população microbiana a ser estudada (WENCEWICZ, 2016; NORONHA *et al.*, 2017). Nesta perspectiva, o solo da Caatinga representa um local com potencial promissor para investigação da comunidade de actinobactérias, uma vez que apresenta características climáticas singulares e diferente das encontradas em outros biomas brasileiros (DEANGELIS *et al.*, 2008; BONONI *et al.*, 2017). Estudos presentes na literatura já demonstram o sucesso em isolar e identificar espécies de actinobactérias produtoras de metabólitos antibióticos frente a micro-organismos de interesse clínico a partir da rizosfera de plantas da Caatinga (VASCONCELOS *et al.*, 2014; SILVA-LACERDA *et al.*, 2015).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi a identificação de linhagens de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Ziziphus joazeiro*, uma árvore endêmica da Catinga, e a avaliação do potencial destas linhagens quanto a produção de metabólitos antimicrobianos frente a isolados clínicos de *S. aureus*.

.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar, caracterizar e avaliar o potencial antimicrobiano de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Ziziphus joazeiro* do bioma Caatinga.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizar a taxonomia polifásica para identificar e classificar os isolados de actinobactérias;

Avaliar a produção de enzimas extracelulares;

Analisar a presença de atividade antimicrobiana frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*;

Identificar a actinobactéria produtora de metabólito(s) bioativo(s);

Definir condições de cultivo para produção dos metabólitos bioativos por meio de fermentação submersa;

Realizar a extração do metabólito bioativo;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O SEMIÁRIDO BRASILEIRO: O BIOMA CAATINGA

A região semiárida brasileira ocupa aproximadamente 969.589,4 km², cerca de 18,2% do território nacional, sendo composta por oito estados do Nordeste: Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e parte do estado de Minas Gerais (SOUZA *et al.*, 2015). Esta região abrange mais de 20% dos municípios brasileiros (1.135 municípios) e abriga cerca de 11,84% da população do país, portanto mais de 23,8 milhões de brasileiros/as vivem na região, segundo estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2014, sendo aproximadamente 61,97% na área urbana e cerca de 38,03% no espaço rural (IBGE, 2014).

No Nordeste, dos seus oito estados, metade tem mais de 85% de sua área caracterizada como semiárida. O Rio Grande do Norte lidera a lista com 93,4% do território semiárido. Depois, vem Pernambuco com 88%, seguido do Ceará e Paraíba com 86%. Nos demais estados, também há uma predominância do semiárido: 69,7% da Bahia, 59,9% do Piauí, 50,9% do Sergipe e 45,6% de Alagoas (ASABRASIL, 2017).

No Semiárido ocorrem dois biomas: a Caatinga e o Cerrado. A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro e foi reconhecido como uma das 37 grandes regiões naturais do planeta, ao lado da Amazônia e do Pantanal (BATISTA e CAMPOS, 2014).

O termo Caatinga deriva do Tupi-guarani, *Ka-a* (mata) e *tinga* (branca), mata branca, isto se deve a característica da paisagem durante o período de estiagem quando a vegetação perde as folhas e restam os troncos e arbustos com aspecto seco (MACHADO, 2013). A Caatinga tem uma importância fundamental para a biodiversidade do planeta, pois 1/3 de suas plantas e 15% de seus animais são espécies que não existem em nenhuma outra parte do mundo (SILVA-LACERDA *et al.*, 2016). Este bioma possui condições climáticas marcantes com precipitações pluviométricas irregulares associadas a altas temperaturas durante boa parte do ano. Além dessas características o relevo é irregular, os solos são rasos com baixa fertilidade e pouco teor de matéria orgânica (SOUZA *et al.*, 2016).

A Caatinga originalmente abrangia uma área de aproximadamente 1 milhão de km². Atualmente, sua área remanescente é de 844.453 km², sendo que menos de 1% está sob proteção de unidades de conservação. O desmatamento para retirada de lenha é uma das principais atividades que contribuem para a desertificação, a seca e a perda da biodiversidade deste bioma (PACCHIONI *et al.*, 2014; ASABRASIL, 2017).

Lamilla *et al.* (2016) também relatam a produção de enzimas extracelulares por actinobactérias isoladas das Ilhas Shetland do Sul (Antártica). Os resultados mais expressivos foram para presença de proteases, amilases e esterases.

3.3 COCOS GRAM-POSITIVOS DE INTERESSE CLÍNICO

O grupo dos cocos Gram-positivos abrange um serie de gêneros bacterianos que são caracterizados morfotintorialmente por apresentar células esféricas, parede celular constituída por uma espessa camada de peptidoglicano e que, na coloração de Gram, se coram pelo cristal violeta e são resistentes a descoloração pelo álcool acetona (WEIDENMAIER e PESCHEL, 2008).

Entre os representantes dos vários gêneros de cocos Gram-positivos, apresentam maior relevância aqueles que podem desencadear importantes quadros infecciosos no ser humano e em outros animais. No que diz respeito aos patógenos humanos, os agentes clinicamente mais importantes são o *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus agalactiae* (KONEMAN, 2008).

O *S. aureus* é o agente infeccioso gram-positivo mais comumente isolado em infecções nosocomiais. Além dos fatores de virulência naturalmente expressos, há cepas de *S. aureus* com importantes fenótipos de resistência aos antibióticos de uso clínico (KUROKAWA, TAKAHASHI e LEE, 2016).

3.3.1 *Staphylococcus aureus*: características gerais

S. aureus é uma bactéria comensal no corpo humano habitando a camada superficial da pele e a mucosa da nasofaringe (FOSTER *et al.*, 2014). As infecções causadas por este agente se devem a aquisição de cepas oriundas do ambiente, especialmente no que diz respeito ao ambiente hospitalar, ou perturbação na homeostase do hospedeiro, ocasionando uma imunodepressão e favorecendo a infecção por *S. aureus* da microbiota residente (ROCHA *et al.*, 2017).

Os fatores de virulência naturalmente expressos por *S. aureus* incluem cápsula, proteínas da superfície celular, enzimas extracelulares e toxinas (Quadro 1). Os fatores de virulência expressos por esta bactéria associados a uma condição favorável no ambiente facilitam o processo infeccioso (FOSTER, 2005; PATERSON, HARRISON e HOLMES, 2014).

A vegetação da Caatinga possui características bem estabelecidas: árvores baixas e arbustivas que, geralmente, perdem as suas folhas na estação seca (espécies caducifólias), além de muitas cactáceas (SOUZA *et al.*, 2015). A Caatinga apresenta três categorias de plantas: arbóreo (8 a 12 metros), arbustivo (2 a 5 metros) e o herbáceo (abaixo de 2 metros). No entanto, é importante destacar que algumas espécies não perdem as suas folhas no período seco, entre elas destaca-se o juazeiro (*Ziziphus joazeiro*), uma das plantas mais típicas desse bioma (FERREIRA, 2016). Ao caírem as primeiras chuvas no fim do ano, a Caatinga perde seu aspecto rude e torna-se rapidamente verde e florida (MELO e AXIOLE, 2016).

O clima presente na Caatinga é quente e seco, com índices pluviométricos muito baixos, em torno de 250 a 900 mm anuais, o que proporciona uma fisionomia desértica ao bioma. As áreas de planície estão sujeitas a um período de seca muito mais longa e severa que as áreas planálticas, período que dura aproximadamente sete meses, mas que às vezes pode chegar até doze meses. A taxa de precipitação anual é mais baixa, bem como também as temperaturas são, em geral, mais altas (entre 27 °C e 29 °C) (LOPES *et al.*, 2016).

É um bioma com grande importância, não somente pela notável diversidade biológica, com várias espécies endêmicas, mas também porque essas espécies são adaptadas a uma precipitação irregular (SILVA *et al.*, 2013). Ao nível do solo, essas condições contribuem para duas estruturas comunitárias microbianas diferentes. Durante o período seco, as comunidades bacterianas são dominadas por representantes do filo Actinobacteria, enquanto que durante a estação chuvosa são dominados por representantes do filo Proteobacteria (KAVAMURA *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2016). Como um resultado, seus habitantes foram selecionados para a capacidade de suportar tais condições (TAKETANI *et al.*, 2017).

O solo sob vegetação de Caatinga é um habitat bastante peculiar, com características próprias cuja atividade biológica é extremamente rica e ainda muito pouco explorada. Entre os micro-organismos, as actinobactérias constituem um grupo representativo em termos de riqueza e diversidade (SILVA, MARTIS e MARTINS, 2015).

3.1.1 *Ziziphus joazeiro* Mart.

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais; tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006).

No entanto, embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a Organização Mundial Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional como recurso para sua atenção primária a saúde, tendo em vista que cerca de 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005; SANTOS *et al.*, 2011; SARAIVA *et al.*, 2015). No entanto, não se pode desconsiderar que a exploração destes recursos, ainda que necessária, gera um impacto ambiental na sua disponibilidade em longo prazo e, portanto, se faz necessário enfatizar a importância da utilização de modo racional (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). A perda da diversidade biológica é a principal consequência de um processo extrativista desenfreado (MELO-BATISTA e OLIVEIRA, 2014).

Entre as plantas utilizadas na medicina tradicional e que são encontradas na Caatinga, o juazeiro é uma das mais conhecidas (DIÓGENES *et al.*, 2014). O gênero *Ziziphus* compreende cerca de 30 espécies, onde nove delas são encontradas no Brasil. A espécie *Ziziphus joazeiro* Mart., conhecida como juá ou juazeiro, é endêmica do semiárido nordestino; onde é amplamente conhecida devido às suas propriedades medicinais e nutricionais (DANTAS *et al.*, 2014; PARENTE, FILHO e SILVA, 2015). É uma das espécies do bioma Caatinga bastante utilizada na medicina popular como expectorante, no tratamento de bronquites e de úlceras gástricas, na fabricação de cosméticos e creme dental, além de servir na alimentação de animais, principalmente nos períodos de seca (OLIVEIRA *et al.*, 2012; FONSECA *et al.*, 2017). É uma das poucas espécies vegetais que mantem as folhas verdes mesmo durante os períodos de seca devido ao seu sistema radicular largo e profundo (COSTA *et al.*, 2016).

Extratos obtidos de várias partes da planta apresentam-se ricos em taninos, flavonoides e, principalmente, saponinas; o que justifica a utilização desta planta na produção de sabonetes e detergentes (BRITO *et al.*, 2015). Araújo *et al.* (2017) indicam que associação de raspas da entrecasca de juazeiro associado ao creme dental reduz a formação de biofilme na superfície dentária.

Silva *et al.* (2011) analisaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Ziziphus joazeiro* Mart. por meio de uma investigação comparativa entre cascas e folhas contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae*; como resultado, observaram que o extrato com atividade mais expressiva foi o da casca, que inibiu 66,66% dos micro-organismos.

Alviano *et al.* (2008) avaliaram extrato aquoso da entrecasca contra bactérias da microbiota oral que são associadas a doenças periodontais (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*) e obtiveram bons resultados de inibição. A atividade antioxidante também foi avaliada e o extrato demonstrou um relevante potencial antioxidante.

Brito *et al.* (2015) também indicam a utilização do extrato de folhas de juazeiro com ação moduladora na resistência de cepas *Enterobacter aerogenes* frente a gentamicina e amikacina e *S. aureus* frente a gentamicina. Gomes *et al.* (2016) encontraram resultados positivos ao avaliar a ação anti-helmíntica de extratos brutos de casca de juazeiro e suas frações frente a nematoides parasitas gastrointestinais de caprinos.

3.2 ACTINOBACTÉRIAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

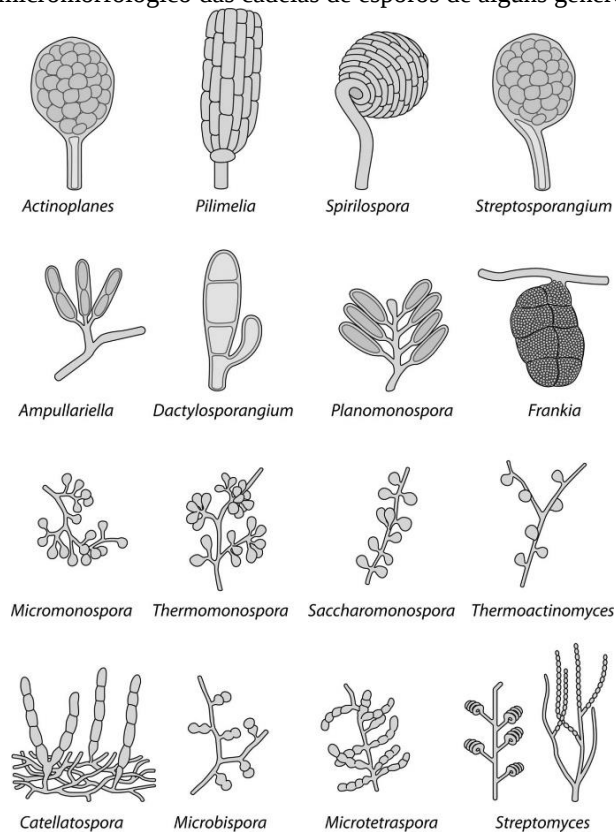
Actinobactérias são bactérias Gram-positivas, com organização filamentosa e formação de cadeias de esporos com morfologias diversas (BARKA *et al.*, 2016; LAL *et al.*, 2016). São habitantes de diversos ambientes naturais (terrestres e aquáticos), sendo o solo o maior reservatório desse grupo de micro-organismos, além de estabelecer relações mutualísticas com animais (estando presente no revestimento epitelial, pelos ou trato gastrointestinal) e plantas (formando a comunidade epifítica e/ou endofíticos) (SALCEDO *et al.*, 2016). No cultivo em meio sólido apresentam colônias com tamanho e morfologias variadas sendo, geralmente, grandes, secas, pigmentadas, com formação coriácea e crescimento arraigado na superfície do meio de cultura o que ocasiona uma resistência a coleta com alça bacteriológica (KIM *et al.*, 2016).

As actinobactérias representam uma das maiores unidades taxonômicas entre as 18 maiores linhagens atualmente reconhecidas no domínio *Bacteria*. O filo Actinobacteria inclui 6 classes, 9 ordens e 14 subordens, 55 famílias, 240 gêneros e, atualmente, cerca de 3000 espécies (GOODFELLOW e FIEDLER, 2010; MUSLEH *et al.*, 2016). A identificação de actinobactérias ocorre usualmente por meio de uma abordagem polifásica que envolve dados fenotípicos, quimiotáxicos e genéticos (ARAÚJO-MELO *et al.*, 2016).

Os arranjos micromorfológicos das cadeias de esporos também são importantes critérios de identificação, pois a maioria dos gêneros de actinobactéria apresenta uma organização e arranjo espaciais próprios. A observação de tais características ocorre através da realização de microcultivo em lâmina (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966) e observação ao microscópio ótico ou preparação desta amostra e utilização de microscopia eletrônica (LI *et al.*, 2016). A figura 1

traz uma ilustração do aspecto micromorfológico da cadeia de esporos de alguns gêneros de actinobactérias.

Figura 1 - Aspecto micromorfológico das cadeias de esporos de alguns gêneros de actinobactérias.



Fonte: Barka *et al.* (2016).

Os gêneros que compõem o filo Actinobacteria apresentam enorme diversidade em termos de sua morfologia, fisiologia e capacidades metabólicas (CHOI *et al.*, 2016). Entre eles, o gênero *Streptomyces* recebe maior destaque devido a sua grande capacidade para biossíntese de moléculas bioativas e biodegradação de compostos orgânicos. Entre as moléculas bioativas recebem destaque as enzimas extracelulares, especialmente aquelas de interesse comercial: amilases, celulasas, proteases, pectinases, esterases e lipases; e principalmente, os antibióticos com ação antibacteriana, antifúngica e antineoplásica (BILYK e LUZHETSKYY, 2016).

3.2.1 Potencial biotecnológico de actinobactérias

Actinobactérias são amplamente encontradas no solo, constituindo entre 10 a 50% da comunidade microbiana, onde desempenham um importante papel biológico na decomposição da matéria orgânica juntamente as populações de fungos e outras bactérias (SILVA *et al.*, 2013). Na comunidade rizosférica, região do solo influenciada pelas raízes e que contém grande

diversidade de micro-organismos, as actinobactérias são importantes, pois influenciam no desenvolvimento da planta e protegem as raízes contra agentes patógenos, além disto, produzem vitaminas, compostos ferropoteicos (p. ex.: sideróforos) e fitohormônios (p. ex.: ácido indol acético (AIA)) que atuam como agentes moduladores do crescimento vegetal (PALANIYANDI *et al.*, 2014). Além disso, as actinobactérias atuam inibindo agentes fitopatogênicos através da produção de metabólitos bioativos e ativação do sistema imunológico vegetal (LEWIN *et al.*, 2016).

Em ambientes secos e com baixa disponibilidade de matéria orgânica, como no solo da Caatinga, as bactérias que vivem no solo e habitam a rizosfera estão submetidas a uma pressão seletiva e, por isso, apenas aquelas espécies que toleram tais condições conseguem se estabelecer no ambiente; além de poder conferir certo nível de tolerância às plantas, auxiliando na promoção do seu crescimento e sobrevivência (KAVAMURA *et al.*, 2013). As actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* tem capacidade de decompor substâncias húmicas em função da produção de enzimas peroxidases alterando quimicamente a estrutura de ácido húmicos (FODIL *et al.*, 2012). Os *Streptomyces* são importantes também no processo inicial de decomposição de material orgânico, sendo a maioria das espécies saprófitas (CHATER *et al.*, 2010).

A descoberta de drogas antibióticas como a estreptomicina, candididina e actinomicina durante as décadas de 1930 e 1940, pela equipe do pesquisador Selman Waksman, apresentou as actinobactérias como excelente e promissora fonte de produtos naturais para o mundo (KAMALA e SILVAPEMURAL, 2017). Desde então a busca por novos metabólitos bioativos oriundos das actinobactérias levaram à identificação de antibióticos clinicamente importantes tais como aminoglicosídeos, tetraciclina, rifamicina, glicopeptídeos e outros. Embora alguns outros gêneros de actinobactérias como *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* e *Actinoplanes* sejam utilizados no rastreio de novos produtos naturais, o gênero *Streptomyces* é o mais relevante biotecnologicamente, uma vez que cerca de 500 espécies de *Streptomyces* são responsáveis por produzir entre 70 a 80% dos metabólitos bioativos relacionados com várias atividades biológicas em uso no mercado, especialmente antibióticos (HASSAN *et al.*, 2017).

Os produtos metabólitos de actinobactérias incluem antibióticos, enzimas extracelulares, inibidores enzimáticos, neurotransmissores, terpenóides, pigmentos e promotores de crescimento vegetal (ARAUJO-MELO *et al.*, 2016). Estes micro-organismos também possuem a capacidade de degradar diversos pesticidas, tais como: organoclorados, carbamatos, triazinas, sulfonilureas e acetanilidas. Essa degradação ocorre pela utilização destes compostos como única fonte de carbono (SILVA, 2012).

A emergência causada pelo aumento do número de casos de resistência microbiana, especialmente de bactérias, frente aos antibióticos é um dos problemas de saúde pública mais relevante a nível global, uma vez que apresenta consequências clínicas e econômicas preocupantes (LOUREIRO *et al.*, 2016). Entre as bactérias gram-positivas de maior relevância destacam-se o *Enterococcus* spp. e o *Staphylococcus aureus*, enquanto que entre as gram-negativas estão o *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (MENEZES, PORTO e PIMENTA, 2016; LOUREIRO *et al.*, 2016; ALÓS, 2016). Devido a este quadro preocupante, o incentivo a busca de espécies de actinobactérias produtoras de metabólitos antimicrobianos continua sendo uma importante linha de estudo (TOMASETO, 2016; RAMÍREZ e CALZADÍAZ, 2016).

Silva-Lacerda *et al.* (2015) demonstram a atividade antibacteriana de *Streptomyces parvulus* isolado da rizosfera de *Poincianella pyramidalis* frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Lee *et al.* (2014) também relataram atividade antibacteriana de linhagens de *Streptomyces* spp. isolados de região de manguezal na cidade de Kuantan (Pahang, Malásia) frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Assim como Cunha *et al.* (2014) que discutem a atividade de actinobactérias isoladas de *Ipomoea pes-caprae* (L.) frente a cocos gram-positivos de interesse médico, além do potencial para produção da enzima L-asparaginase.

Vasconcelos *et al.* (2016), estudando uma linhagem de *Streptomyces ansochromogenes* isolado da rizosfera de *Terminalia fagifolia*, demonstram a atividade antifúngica desta actinobactéria frente a cepas de *Candida* spp. (*C. pelliculosa*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*), *Epidermophyton floccosum*, *Fusarium solani*, *Trichophyton* spp. (*T. rubrum* e *T. mentagrophytes*), *Microsporum gypseum* e *Aspergillus niger*. Dalitz *et al.* (2016) evidenciam o potencial antifúngico de actinobactérias (linhagens de *Streptomyces* spp.) isoladas de sedimento marinho da região da Ilha do Mel (Paraná, Brazil) frente a fungos demáceos.

Veena *et al.* (2016) demonstram a atividade antibacteriana de *Streptomyces bluensis* isolado de sedimentos marinhos da região de Chennai (Tamil Nadu, Índia) frente a *Salmonella typhi*. Riquelme *et al.* (2016) relatam o isolamento de actinobactérias a partir de solo de cavernas vulcânicas nas regiões da Columbia britânica (Canadá) e em Azores (Portugal), onde esses isolados demonstraram atividade antibacteriana frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp. e *Listeria monocytogenes*, além de atividade enzimática positiva para xilanase, pectinase, amilase e quitinase.

As infecções cutâneas e de tecidos moles, assim como de feridas cirúrgicas são as formas de doenças mais frequente causada por *S. aureus*, mas estas infecções primárias podem progredir e servir como iniciadores para quadros de bacteremia e sepse. *S. aureus* pode invadir outros sítios anatômicos e causar quadros graves de pneumonia, endocardite, osteomielite e artrite infecciosa, além de colonizar materiais protéticos tornando-os fontes de infecção (PESCHEL e OTTO, 2013; THAMMAVONGSA *et al.*, 2015).

Quadro 1 - Fatores de virulência expressos por *Staphylococcus aureus*.

Continua →

	Fatores de virulência	Função
Estruturas da superfície celular	Cápsula	A cápsula é uma estrutura polissacarídica externa a parede celular que age inibindo a opsonização e fagocitose por leucócitos polimorfonucleares.
	Proteína A	É a proteína que reveste uniformemente a superfície da maioria das estirpes de <i>S. aureus</i> . Possui afinidade para ligação ao receptor Fc das Imunoglobulinas G, desta forma, age neutralizando a ação dos anticorpos, inibindo a ativação do complemento e fagocitose, além de poder induzir reações anafiláticas locais com liberação de histamina.
	Adesinas	Formadas pelo ácido teicóico atuando na fixação da bactéria nas superfícies mucosas através de sua ligação específica à fibronectina (glicoproteína de superfície de membrana citoplasmática).
	Fator coagulante – coagulase ligada	Proteína presente na superfície da célula que reage com a protombina do plasma convertendo-a em trombina e esta converte o fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de uma rede de fibrina ao redor da bactéria o que dificulta o acesso dos leucócitos.
Enzimas	Coagulase	Ativa a protrombina a trombina permitindo a conversão do fibrinogênio em fibrina, independentemente da presença do íon Ca^{+2} e dos fatores V, VI e VII da coagulação sanguínea, provocando a deposição de fibrina em torno do micro-organismo e dificultando a sua fagocitose.
	Catalase	Converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. Promove à resistência do <i>S. aureus</i> a fagocitose, uma vez que os macrófagos secretam o H_2O_2 para destruir a célula fagocitada.
	Hialuronidase	Hidrolisa ácidos hialurônicos presentes na matriz acelular do tecido conectivo, facilitando a invasão e disseminação do <i>S. aureus</i> nos tecidos.
	DNAse, Lipases, esterases e proteases.	Hidrolisam DNA, lipídeos e proteínas, respectivamente. Contribuem para evasão a imunidade inata, invasão e disseminação tecidual.
	Estafilocinase	Dissolve os coágulos de fibrina que podem ser previamente formados por ação da coagulase permitindo a mobilidade da bactéria.
Toxinas	Citotoxinas: Hemolisinas	

	Leucocidina	Ação necrotizante e citolítica principalmente para hemácias, leucócitos e plaquetas. Prejudica a resposta quimiotática dos leucócitos. Altera a permeabilidade da membrana dos leucócitos polimorfonucleares e dos macrófagos resultando na degranulação celular e induzindo a citólise.
	Toxinas α , β , e δ .	Alfatoxina: Lise de hemácias e causam danos as plaquetas em casos de intoxicações graves; Betatoxina: Degrada a esfingomielina, provocando lesões na membrana dos eritrócitos e, conseqüentemente, conduzindo a hemólise; Deltatoxina: Possui propriedades tensoativas, atuando como detergente e sendo responsável pelo efeito sobre a membrana dos eritrócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas. Também inibi a absorção de água pelo íleo desencadeando uma diarreia aguda.
	Toxina esfoliativa	Esfoliatina e a Epidermolisina, responsáveis pela síndrome da pele escaldada. O tipo mais comum de esfoliativa é a ETA, que age sobre a desmogleína, uma proteína que existe nas superfícies das células epiteliais da pele e que promove a adesão entre elas.
	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico	Atua como um superantígeno causando uma resposta imune exacerbada. Os sintomas começam de forma súbita e envolve febre, dores de cabeça, vômitos, diarreia profusa, congestão vascular, edema, hipotensão choque. Configurando a Síndrome do Choque Tóxico estafilocócico.
	Enterotoxinas	São peptídeos de pequeno peso molecular. São resistentes às enzimas digestivas e ao calor, não sendo destruídas pelos processos de cocção e esterilização. Agem na parede do estômago e do intestino. São produzidas diversas toxinas, designadas por letras: A, B, C (C1 e C2), C, D, E, F e G. Apresentam relativa resistência ao calor (100°C/ 30 min) e à ação das enzimas digestivas (pepsina, tripsina). Os sinais clínicos envolvem, principalmente, eventos gastrointestinais (vômitos e diarreias profusas) e quadros inflamatórios que variam de acordo com o tipo e quantidade de toxinas ingerida.

Fontes: Elaborado pelo autor com dados de PROCTOR *et al.* (2006); SANTOS *et al.* (2007); CHAMBERS e DELEO (2009); THAMMAVONGSA, MISSIAKAS e SCHNEEWIND (2013); FOSTER *et al.* (2014); THAMMAVONGSA *et al.* (2015).

S. aureus cresce em meios de cultura comuns, caldo ou ágar simples, pH = 7, à temperatura ótima de 37 °C. As colônias formadas em placa, após 18 - 24 horas de incubação, apresentam - se arredondadas, lisas e brilhantes. As provas da catalase, coagulase, manitol salgado e DNase são suficientes para identificação bioquímica desde que sejam atendidos os critérios de qualidade para coleta e processamento da amostra biológica suspeita de infecção (KONEMAN, 2008). Há possibilidade de utilização de testes sorológicos e moleculares para identificação. No entanto os testes moleculares são mais direcionados a investigação de cepas com fenótipo de resistência aos antibióticos a fim de confirmar a presença de genes responsáveis por esses mecanismos (COSTA *et al.*, 2011).

3.3.2 Fenótipos de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*

O processo de aquisição de resistência aos antimicrobianos é um fenômeno natural de adaptação que ocorre em todas as espécies bacterianas, no entanto, o uso massivo de drogas ao longo dos anos, muitas vezes sem a investigação prévia do perfil de susceptibilidade da bactéria, aliado aos fenômenos de conjugação, transformação e transdução aceleraram este fenômeno nas bactérias patogênicas de interesse médico e veterinário (WONG *et al.*, 2016).

A existência de cepas de *S. aureus* resistentes aos antibióticos até então eficientes são descritos desde 1940 quando a penicilina foi adotada como opção terapêutica. Ainda na mesma década já foram identificadas cepas produtoras de penicilinases (CHAMBERS e DeLEO, 2009). Em 1960 foi disponibilizado a meticilina como droga de escolha em infecções por *S. aureus* produtores de penicilinases, uma vez que a meticilina (penicilina semissintética) era resistente a ação daquelas enzimas. Ainda na mesma década já foram relatadas cepas com resistência a meticilina, sendo denominadas de MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) (APPELBAUM, 2006; RODVOLD e MCCONEGHY, 2014).

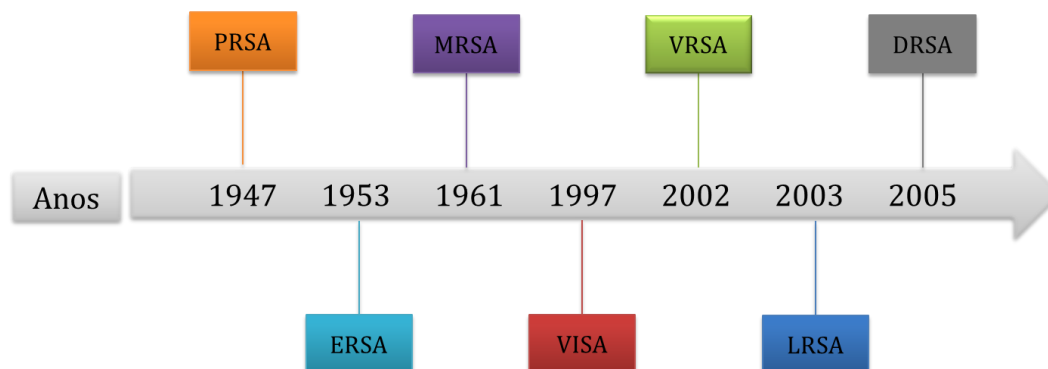
O mecanismo de resistência a meticilina, diferente daquele expresso para as penicilinas antecessoras, não é enzimático. A resistência MRSA é conferida pela aquisição de um elemento genético móvel, *Staphylococcal Chromosome Cassette* (SCCmec) que transporta o gene *mecA* responsável por codificar uma Proteína ligadora da penicilina (PBP) alterada, denominada PBP2a / PBP2' - que tem afinidade reduzida para antibióticos β -lactâmicos, por isso a presença de resistência a meticilina é indicativo de resistência a todas as drogas da classe dos β -lactâmicos. Embora a meticilina tenha sido substituída pela oxacilina e não seja adotada para terapia e realização do teste de sensibilidade aos antibióticos o termo MRSA ainda é largamente utilizado (PATERSON, HARISSON E HOLMES, 2014; PEACOCK e PATERSON, 2015).

A resistência de *S. aureus* a eritromicina, antibiótico da classe dos macrolídeos, é descrita desde a década de 50 logo após a disponibilidade da droga no mercado, em 1953. A eritromicina atua pela ligação ao receptor 23 S do rRNA, que faz parte da subunidade 50 S do ribossomo bacteriano. É uma droga utilizada para tratamento de infecções por *S. aureus* em associação com outros fármacos ou como substituto as penicilinas em pacientes alérgicos, pois bloqueiam a síntese proteica ao invés da parede celular e, embora sejam classificados como bacteriostáticos, podem apresentar efeito bactericida em altas concentrações (COLLI, PIZZOLITTO e RADDI, 2009). A resistência a eritromicina pode ser expressa por três diferentes mecanismos: efluxo ativo, inativação enzimática ou alteração do sítio alvo. A modificação do sítio alvo é codificada pelo gene *erm* e resultam na metilação de uma região

conservada na porção 23s do rRNA, resultando em resistência a eritromicina e também a clindamicina, uma lincosamida, que também atua no mesmo sítio bacteriano (AMORIM *et al.*, 2009).

O glicopeptídeo vancomicina foi aprovado para uso em humanos em 1958, mas devido ao sucesso inicial da meticilina, sua aplicação no mercado foi retardada e este antibiótico só passou a ser utilizada a partir de 1980 como droga de escolha em infecções por MRSA. O mecanismo de ação da vancomicina está relacionado ao radical D-alanil-D-alanina do peptidoglicano, utilizado para formação das ligações cruzadas entre as cadeias de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina. O antibiótico liga-se a este resíduo e impede a utilização dele como substrato para a enzima efetora da reação (GARDETE e TOMASZ, 2014). A resistência aos glicopeptídeos foi primeira descrita em *Enterococcus spp.* o que elevou importância clínica desses agentes, não só porque atuam em infecções mais graves, mas como vetores de disseminação dos genes responsáveis pela resistência à vancomicina aos estafilococos. O primeiro relato de *Enterococcus spp.* resistente à vancomicina ocorreu em 1980, pouco tempo depois já foram descritas cepas de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida a teicoplanina - outro glicopeptídeo com ação semelhante a vancomicina - no Japão, em 1997. O primeiro relato de VRSA (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*) foi realizado em 2002, nos Estados Unidos (McGUINNESS, MALACHOWA e DeLEO, 2017).

O mecanismo genético expresso pelas cepas VRSA é codificado pela família de genes *van*. A expressão destes genes resulta na síntese do radical D-Ala-D-Lac ou invés do D-Ala-D-Ala, logo o glicopeptídeo não consegue se ligar e não exerce sua ação inibitória na síntese da parede celular. As cepas de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA – Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*) não expressão os genes *van*, pois a sensibilidade intermediária à vancomicina está associada a pacientes com históricos de hospitalização prolongada, infecções persistentes, terapia duradoura ou falha no tratamento (VARONA-BARQUÍN *et al.*, 2017).

Figura 2: Identificação dos fenótipos de resistência aos antibióticos expressos por *S. aureus* ao longo dos anos.

PRSA: PENICILLIN RESISTANT *S. aureus*; **ERSA:** ERYTHROMYCIN RESISTANT *S. aureus*; **MRSA:** METHICILLIN RESISTANT *S. aureus*; **VISA:** VANCOMYCIN INTERMEDIARY *S. aureus*; **VRSA:** VANCOMYCIN RESISTANT *S. aureus*; **LRSA:** LINEZOLID RESISTANT *S. aureus* **DRSA:** DAPTOMYCIN RESISTANT *S. aureus*

Fonte: O autor (2018).

A alternativa para tratamento de cepas de *S. aureus* VISA e VRSA é a utilização da oxazolidona, linezolida, liberada para uso em 2001 e do lipopeptídeo daptomicina, lançado em 2003 (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010; HUANG *et al.*, 2017).

A linezolida é o primeiro antibiótico da classe das oxazolidona, e exerce sua função atuando sobre a fração 23 S do ribossomo bacteriano, impedindo que se associe ao 5 S para formar a subunidade 50 S, impossibilitando o início da síntese proteica (ARIAS e MURRAY, 2015). O mecanismo mais comum de resistência a linezolida expressos pelos isolados de MRSA é alteração de regiões conservadas da porção 23S do ribossomo bacteriano, é também nesta porção do ribossomo que agem as drogas eritromicina e clindamicina. Autores relatam que uma RNA metiltransferase, denominada *Cfr*, é a causa de um novo fenótipo de resistência à fenicóis e clindamicina, o qual também confere resistência a oxazolidinonas (WILSON *et al.*, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2012).

Daptomicina (DAP) é um lipopeptídeo cíclico com ação bactericida e dependente de cálcio. Ao se ligar ao cálcio o DAP adquire carga positiva e consegue interagir com os lipídeos aniônicos da membrana bacteriana, especialmente o fosfatidilglicerol e a cardiolipina, integrando-se a membrana, resultando em alterações da permeabilidade e extravasamento de íons, como o potássio (TRAN, MUNITA e ARIAS, 2015). O mecanismo de resistência a DAP está relacionado a adição de resíduos de lisina ao fosfatidilglicerol da membrana bacteriana, contribuindo para uma carga residual mais positiva e dificultando a interação do complexo DAP-cálcio por repulsão eletrostática (BAYER, SCHNEIDER e SAHL, 2013; POPELLA *et al.*, 2016)).

A resistência bacteriana aos antibióticos é um dos problemas de saúde pública mais importante a nível mundial, pois muitas espécies de bactérias estão deixando de responder aos antibióticos disponíveis na indústria farmacêutica, mesmo aqueles considerados “padrão-ouro” para tratamento de determinado quadro infeccioso. Além disso, as infecções multirresistentes representam um forte impacto não apenas na saúde, mas na economia também, uma vez que uma infecção de difícil tratamento resulta em pacientes internados por mais tempos nos serviços de saúde e afastado do mercado de trabalho (LOUREIRO *et al.*, 2016).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego da taxonomia polifásica permitiu a caracterização das linhagens de actinobactérias a nível de gênero e uma identificação de a nível de espécie. Todas as linhagens de apresentaram potencial para produção de enzimas extracelulares e duas delas apresentaram também resultados positivos para atividade anti-estafilococica. A prospecção dos metabólitos antimicrobianos permitiu a definição das condições de cultivo e obtenção do extrato bruto, embora a linhagem J181, identificada com *Streptomyces diastatochromogenes*, tenha apresentado valores de CMI para o extrato bruto acima do que pode ser considerado ideal quanto a ação frente as cepas de *S. aureus*.

REFERENCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the *Caatinga* (Semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALÓS, J. Resistencia antimicrobiana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692-699, 2015.
- ALVIANO, W. S. et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of oral biology**, v. 53, p. 545-552, 2008.
- AMORIM, D. M. R. et al. Resistência induzível à clindamicina entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. **O mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 401-5, 2009.
- APPELBAUM, P. C. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. s1, p. 16-23, 2006.
- ARAÚJO, E. et al. Atividade antimicrobiana do *Ziziphus joazeiro* Mart: uma contribuição orgânica para a odontologia. **Jornada Odontológica dos Acadêmicos da Católica**, v. 2, 2017.
- ARAÚJO-MELO, R. O. et al. Actinobacteria: Versatile Microorganisms with Medical and Pharmaceutical Application. **British Biotechnology Journal**, v. 15, 2016.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. A new antibiotic and the evolution of resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 12, p. 1168-1170, 2015.
- ASABRASIL. Articulação no semiárido brasileiro. Disponível em: <<http://www.asabrazil.org.br/Portal/Informacoes>> Acesso em 13 de julho de 2017.
- BARKA, E. A. et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.
- BATISTA, N.; CAMPOS, C. H. Caracterização do semiárido brasileiro. **Conselho nacional de segurança alimentar e nutricional**. Brasília, 2014.
- BAYER, A. S.; SCHNEIDER, T.; SAHL, H. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, n. 1, p. 139-158, 2013.
- BILYK, O.; LUZHETSKYY, A. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 98-107, 2016.
- BOEV, C.; KISS, E. Hospital-acquired infections: current trends and prevention. **Critical Care Nursing Clinics**, v. 29, n. 1, p. 51-65, 2017.
- BONONI, L. et al. Higher phylogenetic diversity prevents loss of functional diversity caused by successive drying and rewetting cycles. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-13, 2017.

BRASIL, **Ministério da Saúde**. Política Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF. 2006.

BRITO, S. M. O. et al. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC–DAD. **Food Chemistry**, v. 186, p. 185-191, 2015.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629, 2009.

CHATER, K. F. et al. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. 171-198, 2010.

CHOI, J. et al. Report on 31 unrecorded bacterial species in Korea that belong to the phylum *Actinobacteria*. **Journal of Species Research**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2016

CHUSRI, S. et al. Impact of antibiotic exposure on occurrence of nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection: a case control study. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 2, p. 90-95, 2015.

COLLI, V. C.; PIZZOLITTO, A.; RADDI, M. S. G. Determinação da resistência de *Staphylococcus aureus*: um desafio? **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 115-118, 2009.

COSTA, J. D. S. et al. Methods for overcoming seed dormancy and the initial growth of *Ziziphus joazeiro* Mart. in different soils. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 2. P. 441-449, 2016

CUNHA, I. G. B. et al. Biotechnological potential of actinobacteria isolated from rhizosphere of medicinal plant, *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. BR. **African Journal of Microbiology Researcher**, v. 8, n. 52, p. 4020-4026, 2014.

DALITIZ, C. A. et al. Potential for biocontrol of melanized fungi by actinobacteria isolated from intertidal region of Ilha Do Mel, Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 32-36, 2017.

DANTAS, F. C. P. et al. *Ziziphus joazeiro* Mart. - Rhamnaceae: características biogeoquímicas e importância no bioma Caatinga. **Revista Principia**, n. 25, 2014.

DEANGELIS, K. et al. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v. 3, p. 168-178, 2008.

DIOGENES, F. E. P. et al. Allelopathic activity of the leaf extract *Ziziphus joazeiro* Mart. – Rhamnaceae. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 4, p. 01-04, 2014.

ELBENDARY, A. A. et al. Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2017.

FERREIRA, P. R. S. Caracterização da diversidade bacteriana de solos da caatinga (Ceará) de áreas preservadas e sob condições de desertificação. Monografia. 2016.

FODIL, D. et al. A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. strain AH4: Purification and biochemical characterization. **Bioresource technology**, v. 111, p. 383-390, 2012.

FONSECA, F. C. S. et al. Betulinic Acid from *Zizyphus joazeiro* Bark Using Focused Microwave-Assisted Extraction and Response Surface Methodology. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 50, p. 226-229, 2017.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49, 2014.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948, 2005.

GARAU, J. et al. Antibiotic stewardship challenges in the management of community-acquired infections for prevention of escalating antibiotic resistance. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 2, n. 4, p. 245-253, 2014.

GARDETE, S.; TOMASZ, A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 7, p. 2836-2840, 2014.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H.. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 119-142, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HASSAN, S. S. et al. Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 49, P. 34-37, 2017.

HUANG, D. B. et al. In Vitro Activity of Iclaprim against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nonsusceptible to Daptomycin, Linezolid, or Vancomycin: A Pilot Study. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2017, 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014.

KAMALA, K.; SIVAPERUMAL, P. Chapter Five-Biomedical Applications of Enzymes From Marine Actinobacteria. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 80, p. 107-123, 2017.

KAVAMURA, V. N. et al. Water Regime Influences Bulk Soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* Bacterial Communities in the Brazilian Caatinga Biome. **Plos One**, v. 8, n.9, 2013.

KIM, M. et al. A report of 38 unrecorded bacterial species in Korea, belonging to the phylum Actinobacteria. **Journal of Species Research**, v. 5, n. 2, p. 223-234, 2016.

KONEMAN, Elmer W.; ALLEN, Stephen. **Koneman: Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas**. Ed. Médica Panamericana, 2008.

- KUROKAWA, K.; TAKAHASHI, K.; LEE, B. L. The staphylococcal surface-glycopolymer wall teichoic acid (WTA) is crucial for complement activation and immunological defense against *Staphylococcus aureus* infection. **Immunobiology**, v. 221, n. 10, p. 1091-1101, 2016.
- LAL, D. et al. Codon usage bias in phylum Actinobacteria: relevance to environmental adaptation and host pathogenicity. **Research in microbiology**, v. 167, n. 8, p. 669-677, 2016.
- LAMILLA, C. et al. Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable Actinobacteria from the South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**, 2016.
- LEE, L. et al. Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- LEWIN, G. R. et al. Evolution and Ecology of *Actinobacteria* and Their Bioenergy Applications. **Annual Review of Microbiology** p. 235–254, 2016.
- LI, L. et al. Diversity and Antimicrobial Activities of Actinobacteria Isolated Medical and Pharmaceutical Application. **British Biotechnology Journal**, v. 15, n. 4, p. 1-13, 2016.
- LING, L. L. et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455, 2015.
- LOPES, F. A. C. et al. Microbial Community Profile and Water Quality in a Protected Area of the Caatinga Biome. **Plos One**, v.16, 2016.
- LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.
- MACHADO, C. G. **A Caatinga e suas aves**. Com Ciência, n. 149, 2013.
- MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Focus: Infectious Diseases: Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 2, p. 269, 2017.
- MELO, R. K. A. F.; AXIOLE, N. M. C. Caracterização econômica-ecológica do bioma Caatinga. **I seminário nordestino de desenvolvimento sustentável**, 2016.
- MELO-BATISTA, A. A.; OLIVEIRA, C. R. M. Plantas utilizadas como medicinais em uma comunidade do Semiárido baiano: saberes tradicionais e a conservação Ambiental. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 74, 2014.
- MENEZES, J. M. R.; PORTO, M. L. S.; PIMENTA, C. L. R. M. Profile of bacterial infection in a hospital environment. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 2, p. 199-207, 2016.
- MUSLEH, S. S. et al. Molecular taxonomy and community dynamics of Actinobacteria in marine sediments off central Chile. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 51, n. 1, p. 89-100, 2016.

NORONHA, M. F. et al. Taxonomic and functional patterns across soil microbial communities of global biomes. **Science of The Total Environment**, v. 609, p. 1064-1074, 2017.

OLIVEIRA, G. et al. Conserving the Brazilian semiarid (Caatinga) biome under climate change. **Biodiversidade e Conservação**, v. 21, p. 2913-2926, 2012. (b)

PACCHIONI, R. G. et al. Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. **Microbiology Open**, v. 3, n. 3, p. 299-315, 2014.

PALANIYANDI, S. A. et al. Streptomyces sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 3, p. 766-773, 2014.

PARENTE, K. M. S.; PARENTE FILHO, E. G.; SILVA, E. V. Allelopathic of *Ziziphus joazeiro* Mart. about *Lactuca sativa* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. **Revista Fitos**, v. 9, n. 2, p. 73-159, 2015.

PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42-47, 2014.

PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual review of biochemistry**, v. 84, p. 577-601, 2015.

PESCHEL, A.; OTTO, M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 667, 2013.

POPELLA, P. et al. VraH Is the Third Component of the *Staphylococcus aureus* VraDEH System Involved in Gallidermin and Daptomycin Resistance and Pathogenicity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2391-2401, 2016.

PROCTOR, R. A. et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 295, 2006.

QUEIROZ, G. M. et al. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira Clínica Médica de. São Paulo**, v. 10, n. 2, p. 132-8, 2012.

RAMÍREZ, M. V.; CALZADÍAZ, L. Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Cap 13: Industrial Enzymes and Metabolites from Actinobacteria in Food and Medicine Industry. **INTECH**, 2016.

RIQUELME, C. et al., Biotechnological potential of Actinobacteria from Canadian and Azorean volcanic caves. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 843–857, 2017.

ROCHA, L. C. et al. Nasopharyngeal and Oropharyngeal Colonization by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* and Prognostic Markers in Children with Sick Cell Disease from the Northeast of Brazil. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 217, 2017.

RODVOLD, K. A.; MCCONEGHY, K. W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. **Clinical infectious diseases**, v. 58, n. suppl_1, p. S20-S27, 2014.

SAINT, S. Can intersectional innovations reduce hospital infection? **Journal of Hospital Infection**, v. 95, n. 2, p. 129-134, 2017.

SALCEDO, R. G. et al., Characterization and engineering of the biosynthesis gene cluster for antitumor macrolides PM100117 and PM100118 from a marine actinobacteria: generation of a novel improved derivative. **Microbial Cell Factories**, v. 15, p. 44, 2016.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, R. L. et. al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SARAIVA, M. E. et al, Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141-153, 2015.

SHIRLING, E, B; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of streptomyces species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SILVA, MONIQUE S. et al. Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SILVA, T. C. L. et al. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 2, p. 193-199, 2011.

SILVA, V. M. A.; MARTINS, CLAUDIA M.; MARTINS, SUZANA. C. S. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 2026-2036, 2015.

SILVA-LACERDA, G. R. et al, Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, 2016.

SOUSA, D. M. et al. Infecção por *staphylococcus aureus* resistente em unidades de terapia intensiva: revisão integrativa. **Revista de enfermagem UFPE**, v. 10, n. 4, p. 1315-1323, 2016.

SOUZA, B. I.; MENEZES, R.; ARTIGAS, R. C. Efeitos da desertificação na composição de espécies do bioma Caatinga, Paraíba/Brasil. **Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía**, v. 2015, n. 88, p. 45-59, 2015.

SOUZA, C. A. F. et al, Coprophilous Mucorales (ex Zygomycota) from three areas in the semi-arid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.

SOUZA, L. L. et al. Comissão de controle de infecção hospitalar na prevenção de pneumonia associada à ventilação mecânica: contribuições para a enfermagem. **Revista de enfermagem UFPE**, v. 7, n. 11, p. 6471-6476, 2013.

SOUZA, N. G. M. et al. Tecnologias sociais voltadas para o desenvolvimento do semiárido brasileiro. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 12, n. 3, 2016.

TAKETANI, R. G. et al., Dry Season Constrains Bacterial Phylogenetic Diversity in a Semi-Arid Rhizosphere System. **Microbiology Ecology**, v. 73, p. 153–161, 2017

THAMMAVONGSA, V. et al. Staphylococcal manipulation of host immune responses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 529, 2015.

THAMMAVONGSA, V.; MISSIAKAS, Dominique M.; SCHNEEWIND, Olaf. Staphylococcus aureus degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. **Science**, v. 342, n. 6160, p. 863-866, 2013.

TOMASETO, A. A. Investigação do potencial biotecnológico e avaliação da atividade antimicrobiana de linhagens de *Streptomyces* spp. fitopatogênicas. Dissertação. **Instituto Biológico (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios)**, São Paulo, 2012.

TRAN, T. T.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 32-53, 2015.

VARONA-BARQUÍN, A. et al. Vancomycin heteroresistant community associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST72-SCCmecIVa strain colonizing the nostrils of a five-year-old Spanish girl. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)**, v. 35, n. 3, p. 148-152, 2017.

VASCONCELOS, N. M. Investigação do potencial antifúngico e envolvimento de genes biossintéticos em actinobactérias isoladas da Caatinga. Dissertação. **Programa de biotecnologia industrial**, UFPE, Recife, 2016.

VEENA, S. et al. Assessment of anti-typhoid and antioxidant activity of marine actinobacteria isolated from Chennai marine sediments. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 3, p. 166-72, 2016.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005

WANG, L. et al. Characteristics of nosocomial infection and its effects on the survival of chemotherapy patients with advanced non-small cell lung cancer. **Oncology letters**, v. 14, n. 6, p. 7379-7383, 2017.

WEI, Y. et al. Evaluating hospital infection control measures for antimicrobial-resistant pathogens using stochastic transmission models: Application to vancomycin-resistant

enterococci in intensive care units. **Statistical methods in medical research**, p. 0962280215627299, 2016.

WEIDENMAIER, C.; PESCHEL, A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 276, 2008.

WENCEWICZ, T. A. New antibiotics from Nature's chemical inventory. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 24, n. 24, p. 6227-6252, 2016.

WILSON, P. et al. Linezolid resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 186-188, 2003.

WONG, E. S. et al. A 10-Year Review of Ocular Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Clinical Features, and Treatment. **Cornea**, v. 36, n. 1, p. 92-97, 2017.